New Trends in Soil Biology

Proceedings of the VIII. Intl Colloquium of Soil Zoology. Louvain-la-Neuve (Belgium). August 30 - September 2, 1982. Edited by Ph. LEBRUN, H.M. ANDRÉ, A. DE MEDTS, C. GRÉGOIRE-WIBO and G. WAUTHY. Imprimeur DIEU-BRICHART, Ottignies-Louvain-la-Neuve (1983).

Le respiromètre à pression et volume variables. Une technique simple et sensible pour l'étude écophysiologique des animaux du sol

B. VERDIER

Équipe de recherche 204 du C.N.R.S.
Laboratoire d'Écologie Générale du Muséum National d'Histoire Naturelle
4, avenue du Petit Château, F-91800-Brunoy (FRANCE)

Summary :

Based on the differential equation of the gas law N.R.T. = P.V, theory of a new microrespirometer type is discussed in the present paper : variation in length ($\triangle$ l) of a fluid column moving into a glass capillary tube of a given section (s) is dependent on pressure ($\triangle$ P) and volume ($\triangle$ V) variations occurred within the respirometric cell. Oxygen consumption rate ($\dot{O}_2$) is easily calculated as it follows : $\dot{O}_2 = s. \triangle l.(K + K'.L)$, where K and K'.L are experimental data which take into account initial parameters as pressure, volume and temperature. One millimeter of index displacement read along the capillary column corresponds to 3.10^{-3} μl; the accuracy is 5.10^{-4} μl/h at outmost.

The new respirometer is similar to Engelmann's in its shape but its higher sensitivity is alike standard Cartesian diver. This improvement is mainly caused by the presence of a reservoir filled with the manometric fluid at the top-end of the capillary tube. Due to the very simple experimental procedure to get respirometric measurements the new respirometer is specially convenient for serial analysis in ecophysiology, and suits all soil animals whichever is the weight ranging from a few micrograms to one or more milligrams.

Key words : manovolumetric respirometer equations, microrespirometer technique, oxygen consumption measurements.

I. Introduction

La loi des gaz parfaits N.R.T. = P.V est le fondement de toute la respirométrie gazométrique : à température T constante, toute variation dN de la quantité gazeuse N produit les variations dP et dV des paramètres d'état P (pression) et V (volume) selon l'équation différentielle dN.R.T = P.dV + V.dP (a).

La quantité dN est facilement déterminée si un des paramètres P ou V est rendu constant. Ainsi se sont développées les techniques manométriques (à volume constant dN.RT = V.dP) et volumétriques (à pression constante dN.RT = P.dV). Dans la recherche de méthodes à hautes sensibilités, les techniques volumétriques n'ont guère progressé. Elles gardent comme principal avantage leur simplicité d'utilisation (il n'y a pas de calibration des chambres d'incubation) : SCHOLANDER (1942), ENGELMANN (1963), GILSON (1963), VANNIER & VERDIER (1981). Une activité respiratoire d'au moins 5.10^{-2} μl/h est nécessaire pour assurer une mesure significative avec ce principe. Une grande partie de la microfaune du sol ne peut ainsi être prise en compte et il faut alors rechercher d'autres méthodes.

En 1937, LINDERSTRØM-LANG ouvre un champ d'exploitation particulièrement riche de la mesure à volume constant. Le Cartesian diver et ses différents développements se sont progressivement imposés comme une méthodologie de pointe en microrespirométrie. La haute sensibilité de ces techniques, de 10^{-3} à 10^{-6} μl/h, oblige à une description théorique complète qui peut rebuter encore le biologiste habitué aux formulations simples du Warburg et autres Gilson : HOLTER & LINDERSTRØM-LANG (1943), LØVLIE & ZEUTHEN (1962), HOLTER & ZEUTHEN (1966), KLEKOWSKI (1971), NEXØ, HAMBURGER & ZEUTHEN (1972)... Les contraintes expérimentales accompagnant ces techniques en restreignent l'usage pour des études écologiques où la multiplicité et l'éventail des mesures sont de première importance (pour la détermination des équations allométriques spécifiques par ex.). Certains auteurs ont ainsi recherché une simplification méthodologique avec le 'Gradient diver' (NEXØ *et al.*, 1972) pour conduire un travail écologique dans ce sens (PETERSEN, 1981a, b).

La respirométrie à pression constante apparaît bien adaptée pour les animaux dont la biomasse est de l'ordre du milligramme ou plus, alors que la respirométrie à volume constant, par les techniques du ludion, permet l'étude de biomasses de quelques fractions de microgrammes au milligramme et plus. En conséquence, seule cette dernière voie permet l'étude de la plus grande partie de la faune du sol dont la biomasse des individus dépasse rarement le milligramme.

Dans le cadre d'une étude intensive[1] menée sur l'activité respiratoire du Collembole Tomoceridae *Tomocerus minor* (Lubbock) litièricole dont les adultes ont un poids frais de 1,5 à 3 mg, nous avons recherché le moyen d'appréhender l'activité respiratoire des formes juvéniles sans avoir recours à la technicité délicate du ludion. La longue expérience que nous avons du respiromètre à pression constante (type Engelmann) nous a conduit à développer une nouvelle voie de mesures microrespirométriques qui est le trait d'union logique entre les deux voies déjà exploitées.

II. Fondements théoriques de la mesure à pression et volume variables

1. Description du respiromètre

La représentation schématique du respiromètre volumétrique d'Engelmann (Fig. 1a) et du respiromètre mano-volumétrique (Fig. 1b) montre que la chambre respirométrique C et le tube capillaire M sont communs aux deux systèmes. Seule la présence d'un réservoir r à l'extrémité libre du capillaire distingue le second du premier. La section du réservoir r par rapport à la section s du capillaire est telle que toute variation de volume du liquide manovolumétrique dans le capillaire entraîne une variation négligeable de la hauteur d du liquide dans ce réservoir.

2. Principe

Dans le respiromètre à pression constante, le déplacement Δ l de l'index dans le tube capillaire est proportionnel à la variation de volume Δ V de la chambre C, toute chose restant égale par ailleurs.

(1) $\Delta V = -s.\Delta l$ (s = section du capillaire M en mm)

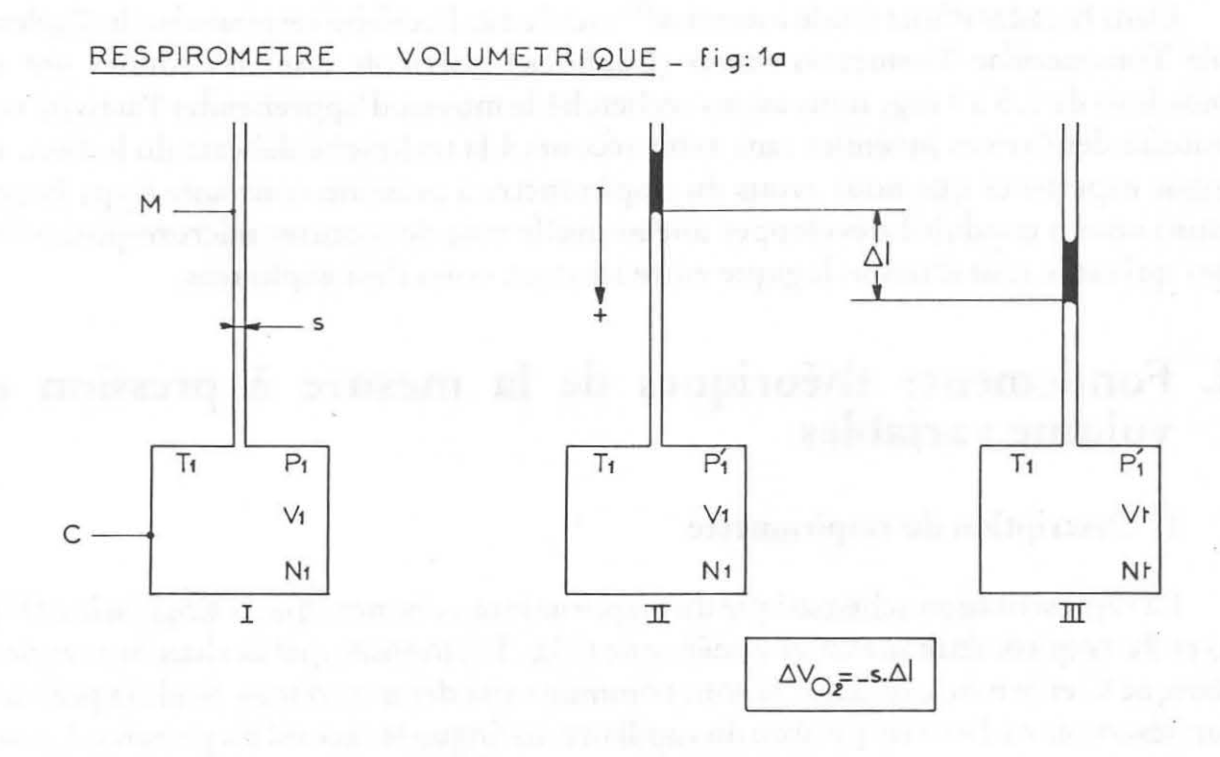
Dans le respiromètre à pression et volume variables, la loi des gaz parfaits P.V = N.R.T définit à tout instant le système gazeux limité par l'unité respirométrique (U.R.) constituée de la chambre C et du capillaire M.

a. Système non chargé (Fig. 1b-I)

Si B est la pression barométrique actuelle, f la pression de vapeur d'eau (saturante ou pas) à la température expérimentale T_1, V_1 le volume total occupé par l'air dans l'unité respirométrique, N_1 la quantité gazeuse présente dans l'U.R., R la constante des gaz, on peut écrire :

(2) $N_I.R.T_I = P_I.V_I$ avec $P_I = B - f$

(1) Recherche effectuée dans le cadre de l'A.T.P. n° 3573 du C.N.R.S. et du Projet PIREN Forêt d'Orléans.





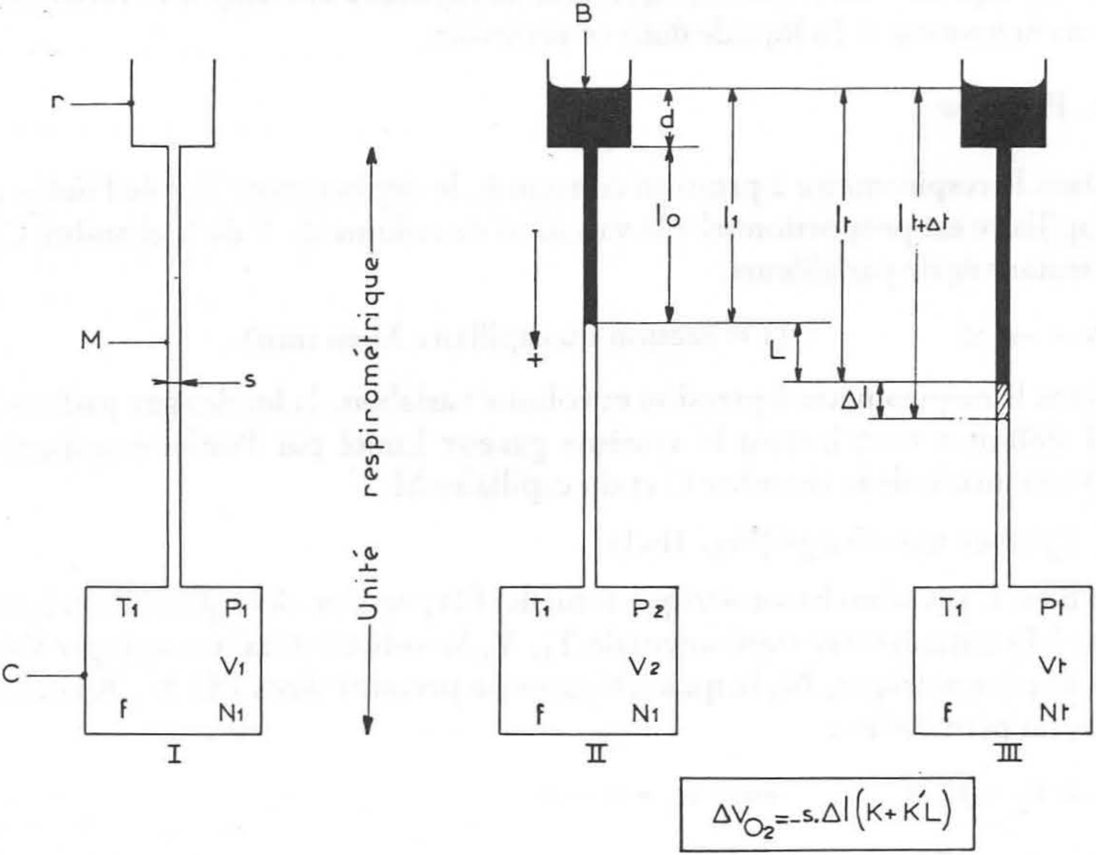


Figure 1 Représentation schématique des respiromètres à pression constante et à pression et volume variables. Les explications sont données dans le texte.

b. Système chargé (Fig. 1b-II)

A l'instant t_o on dépose le liquide mano-volumétrique dans r. Ce liquide pénètre par capillarité et gravité dans le capillaire. La colonne mano-volumétrique ainsi formée s'immobilise quand sa hauteur l_o est telle que la nouvelle pression interne P_2 et le nouveau volume V_2 de l'U.R. satisfont à la loi de Mariotte, toute chose restant égale par ailleurs :

$$P_I . V_I = P_2 . V_2$$

avec $P_2 = B + \rho . lc + \rho . l_I - f$

où $\varrho . l_c$ est la pression capillaire développée dans le tube M, ϱ étant la densité du liquide. Soit d la hauteur du liquide dans le réservoir r. Il devient :

$$P_2 = P_I + \rho . \Sigma l \qquad \text{avec } \Sigma l = lc + lo + d$$

$$V_2 = V_I - s . lo$$

Les équations (2), (3) et (4) donnent :

(5) $P_I . V_I = (P_I + \rho . \Sigma l)\ (V_I - s . l_o)$

qui devient

(6) $s . \rho . l_o^2 + \{ P_I . s - V_I . \rho + s . \rho . (l_c + d) \} . l_o - \rho . V_I . (l_c + d) = 0$

Seule la racine positive est considérée :

(7) $$l_o = \frac{V_I . \rho - s\{P_I + \rho(l_c + d)\} + \sqrt{\{P_I . s - V_I . \rho + s . \rho(l_c + d)\}^2 + 4 . V_I . s . \rho^2 (l_c + d)}}{2 . s . \rho}$$

Ainsi la pénétration l_o du liquide mano-volumétrique dans l'U.R. est fonction à la fois de P_1, V_1, s et du liquide lui-même caractérisé par ϱ et l_c. La figure 2 représente la relation V_1 vs l_o pour des capillaires de différents diamètres ($P_1 = P_o = 10098$ mm H_2O à $T_1 = 293°$ K). Le liquide est de l'eau additionnée de mouillant pour les capillaires de diamètres supérieurs à 0,2 mm. Le liquide est le *m*-Xylène pour les diamètres 0,1 et 0,2 mm. Cette abaque permet de fixer les limites de V_1 pour un capillaire donné afin que l_o demeure dans des limites compatibles avec la longueur du capillaire M utilisé. Il n'est pas nécessaire de calibrer avec précision les chambres d'incubation puisque V_1 intervient par l_o dans l'équation donnant l'activité respiratoire selon la relation tirée de (5) :

(8) $V_I = s . l_o . \dfrac{P_I + \rho . \Sigma l}{\rho . \Sigma l}$ Puis (4) donne (9) $V_2 = s . l_o . \dfrac{P_I}{\rho . \Sigma l}$

3. Équation du respiromètre

a. Calculs

Soient P_t, V_t, N_t et T_1 les paramètres définissant le système gazeux dans la chambre d'incubation à l'instant t. Dans l'intervalle de temps t, t + Δ t la variation ΔN_g de la quantité gazeuse $N_{g,t}$ s'écrit :

(2) donne (10) $\Delta N_g.R.T._I = P_t.\Delta V + V_t.\Delta P$

Le déplacement correspondant Δ l de la colonne mano-volumétrique exprime la variation simultanée de P_t et V_t (par convention Δ l est positif si $l + \Delta l > l$ et négatif si $l + \Delta l < l$). Dans tous les cas de figures, pression et volume évoluent en sens opposés dans l'unité respirométrique; soit alors :

$\Delta V = -s.\Delta l$ et $\Delta P = \rho.\Delta l$

d'autre part : $V_t = V_2 + \Sigma_{t_o}^{t}\Delta V = V_2 - s.\Sigma_{t_o}^{t}\Delta l$

$$P_t = P_2 + \Sigma_{t_o}^{t}\Delta P = P_2 + \rho.\Sigma_{t_o}^{t}\Delta l$$

d'où, par substitution dans (10)

(11) $\Delta N_g.R.T_I = \Delta l.(V_2.\rho - P_2.s - 2.s.\rho.\Sigma_{t_o}^{t}\Delta l)$

soit avec les expression de P_2 (3) et V_2 (9) :

(12) $\Delta N_g.R.T_I = -s.\Delta l.\left\{ P_I.\dfrac{l_c + d}{\Sigma l} + \rho(\Sigma l + 2.\Sigma_{t_o}^{t}\Delta l)\right\}$

Dans les conditions normales de température et de pression (S.T.P.D.)* la variation de volume correspondant est donnée par :

(13) $\Delta N_g.R.T_o = P_o.\Delta V$

qui substituée dans (12) donne :

(14) $\Delta V_{STPD} = -s.\Delta l.\left\{ P_I.\dfrac{l_c + d}{\Sigma l} + \rho(\Sigma l + 2.\Sigma_{t_o}^{t}\Delta l)\right\}.\dfrac{T_o.P_I}{T_I.P_o}$

$$\Delta V_{STPD} = -s.\Delta l.\left\{ \frac{l_c + d}{\Sigma l} + \rho\left(\frac{\Sigma l + 2.L}{P_I}\right)\right\}.\frac{T_o.P_I}{T_I.P_o}$$

ou aux conditions expérimentales (E.T.P.D.)** T_1 et P_1 :

(15) $\Delta V_{ETPD} = -s.\Delta l.\left\{ \dfrac{l_c + d}{\Sigma l} + \rho\left(\dfrac{\Sigma l + 2.L}{P_I}\right)\right\}$ avec $L = \Sigma_{t_o}^{t}\Delta l$

Si le gaz carbonique est absorbé par la potasse, il est évident que

$\Delta N_g = \Delta N_{O_2}$ et $\Delta V = \Delta V_{O_2}$

b. Sensibilité

La relation (15) est de la forme :

(16) $\Delta V = -s.\Delta l(K + K'.L)$ $K = \dfrac{l_c + d}{\Sigma l} + \rho.\dfrac{\Sigma l}{P_I}$ $K' = \dfrac{2.\rho}{P_I}$

cette écriture permet la comparaison immédiate avec l'équation (1) du respiromètre à pression constante. Aux conditions initiales où L = 0, (15) est réduit à la forme

(16') $\Delta V = -s.\Delta l.K$

* S.T.P.D. : Standard temperature, pressure, dry (273° K, 10336 mm H_2O).
**E.T.P.D. : Experimental temperature, pressure, dry.

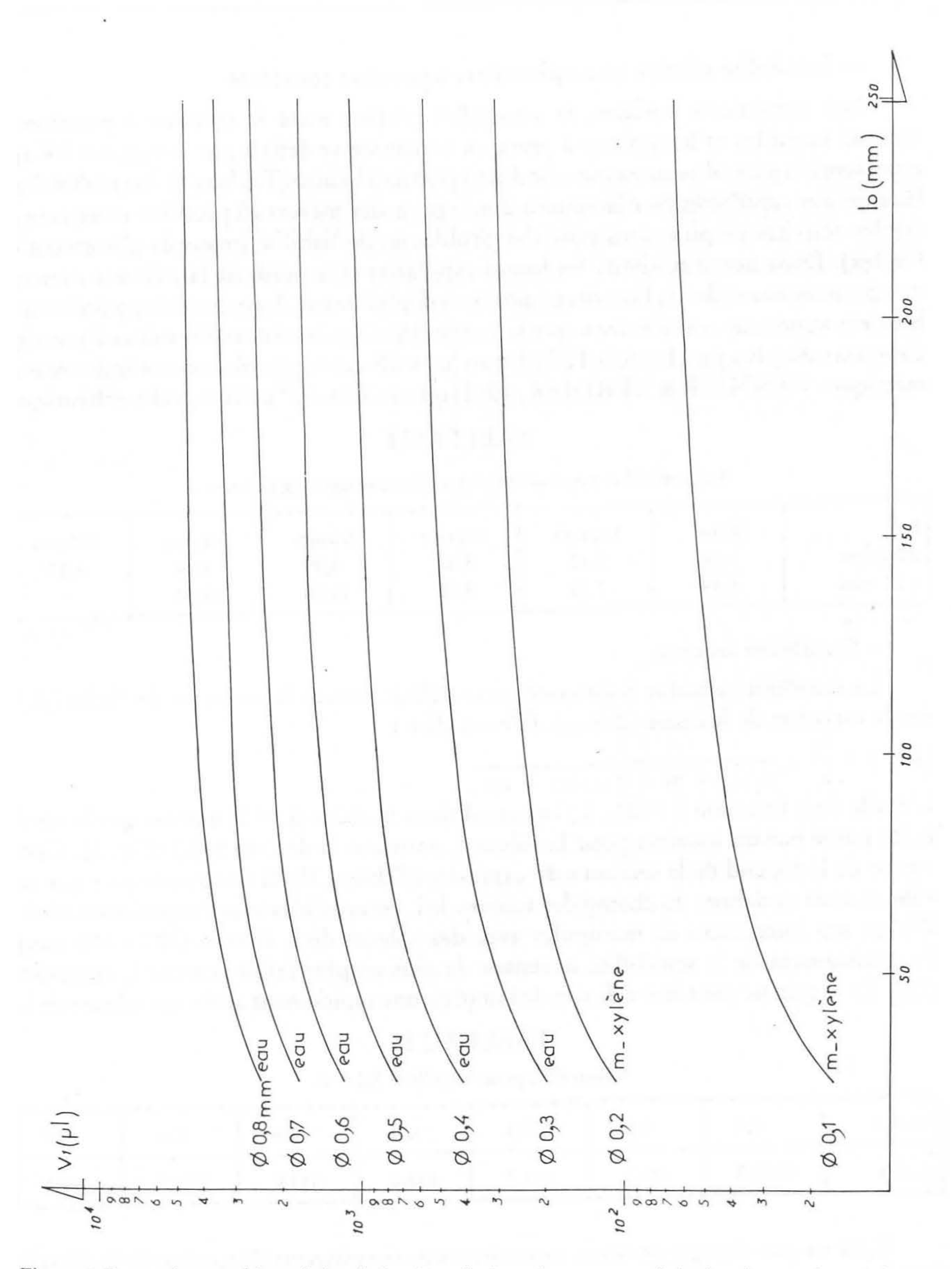


Figure 2 Expression graphique de la relation V_1 vs l_o. Le volume gazeux de la chambre respirométrique est parfaitement connu par la simple lecture de l_o.

— Sensibilité relative au respiromètre à pression constante

Aux conditions initiales, la sensibilité relative entre le système à pression et volume variables et le système à pression constante se définit par le rapport l/K qui représente le gain obtenu en passant d'un système à l'autre (Tableau I). En réalité l'utilisation des capillaires de diamètre 0,2 mm pour des mesures à pression constante de faibles activités respiratoires pose des problèmes de fiabilité (mauvais glissement de l'index). Dans notre système, les forces capillaires et le poids de la colonne exercent une poussée sur celle-ci, favorisant ainsi son déplacement. Le gain réel apparaît sensiblement supérieur compte tenu que la sensibilité effective du respiromètre à pression constante est plus proche de 5.10^{-2} μl/mm (en utilisant le pétrole comme index manométrique; VANNIER & VERDIER, 1981) que de $3,14.10^{-2}$ μl/mm, valeur théorique.

TABLEAU I

Gain relatif au respiromètre à pression constante : ø 0,2 mm.

l_o	50 mm	100 mm	150 mm	200 mm	230 mm	300 mm
ø 0,2 mm	1,96	2,80	3,57	4,29	4,68	5,50
ø 0,1 mm	6,14	7,88	9,51	11,08	11,96	-

– Sensibilité absolue.

La sensibilité absolue S du système se définit comme la variation de l'effet ($\triangle$ l) sur la variation de la cause ($\triangle V_{O2}$). C'est-à-dire :

$$(17) \quad S = \frac{P_I}{s} \cdot \frac{\Sigma l}{P_I(l_c + d) + \rho.\Sigma l(\Sigma l + 2L)}$$

L'étude de la fonction S = f(l_o, L) aux conditions initiales (L = 0) montre que la sensibilité passe par un maxima pour la valeur l_o annulant la dérivée S'(l_o) (Fig. 3). Cette valeur de l_o dépend de la section s du capillaire (Tableau II). Il faut remarquer que ces valeurs sont en dehors du champ des valeurs de l_o compatibles avec l'expérimentation : il n'est pas intéressant de manipuler avec des valeurs de l_o élevées (300 - 350 mm), l'accroissement de la sensibilité devenant de plus en plus faible comme l_o augmente (Fig. 3); le gain ne peut être infini et de fait plafonne rapidement après ces valeurs de l_o.

TABLEAU II

Valeur de l_o pour laquelle S' (l_o) = 0.

Ø mm	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
l_o mm	1052,3	783,3	765,7	678,6	618,6	574,2	539,8

Pour ne pas charger ce texte, nous donnons simplement l'équation de la dérivée S' (l_o) : $S'(l_o) = \frac{P_I}{s} \cdot \frac{P_I(l_c + d) - \rho.\Sigma l^2}{(P_I(l_c + d) + \rho.\Sigma l^2)^2}$

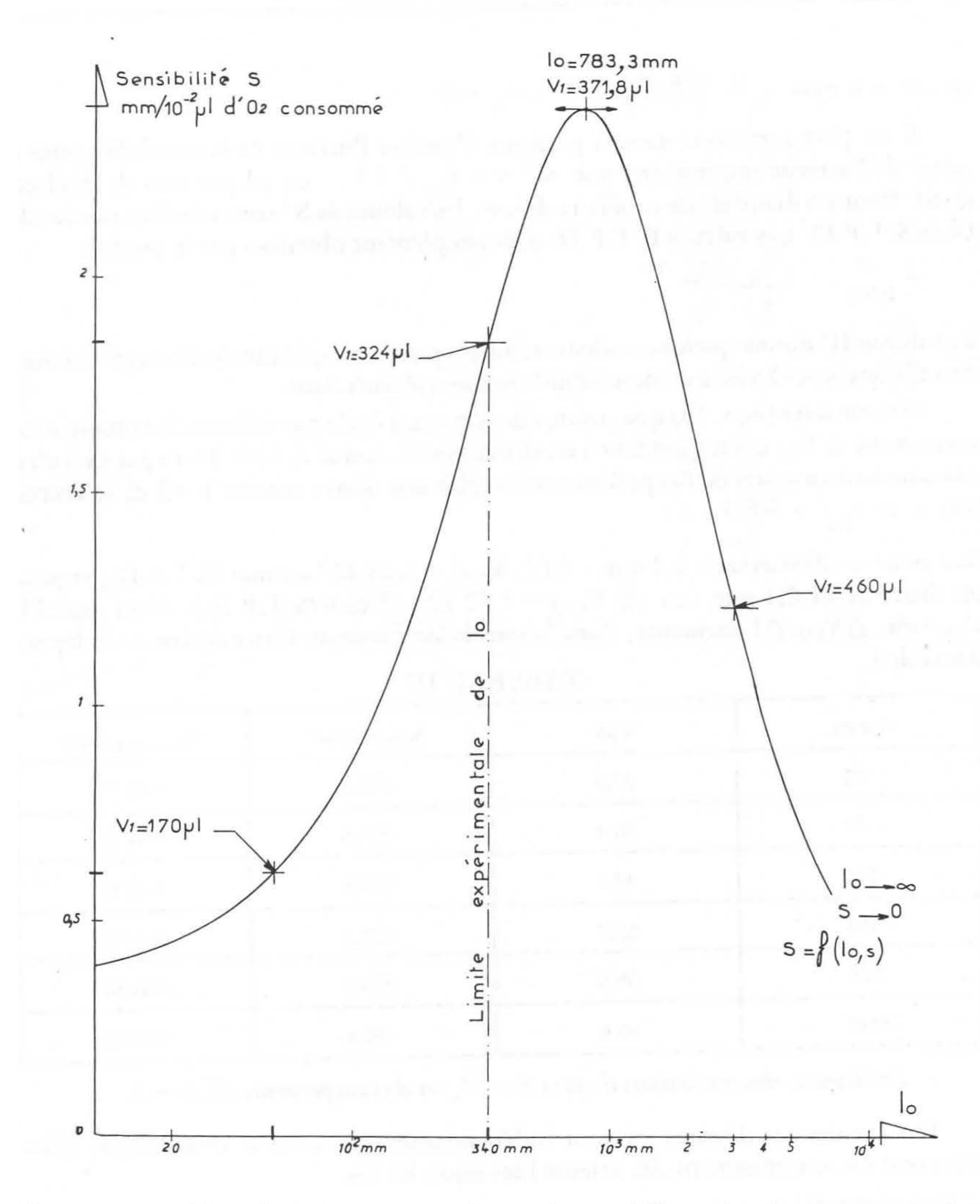


Figure 3 La sensibilité S du respiromètre à pression et volume variables est fonction de paramètres physiques : diamètre du tube capillaire, volume de la chambre d'incubation, densité et viscosité du liquide mano-volumétrique, tension capillaire développée par ce liquide. Tous ces paramètres ainsi que les paramètres d'état sont aisément pris en compte par une calculatrice à programme. La sensibilité théorique maxima (pour S' = 0) ne peut être retenue par l'expérimentateur pour lequel l_o est contenue dans les limites pratiques. En fait, plus l_o augmente (V_1 augmente) plus le gain en sensibilité est faible pour s'annuler (S' = 0) puis devenir négatif. La sensibilité S est nulle pour l_o infini. Exemple pour un capillaire de 0,2 mm de diamètre intérieur.

et $S' = 0$ pour $l_o = \sqrt{\frac{P_I(l_c + d)}{\rho}} - (l_c + d)$

Il est plus commode dans la pratique d'utiliser l'inverse de la sensibilité pour le calcul de l'activité respiratoire. Soit $S^{-I} = \Delta V_{O_2} / \Delta l$ en μl par mm de déplacement. Pour un diamètre de capillaire donné, les valeurs de S^{-1} sont tabulées aux conditions S.T.P.D. Les valeurs E.T.P.D. sont simplement obtenues par le produit

$$S^{-I}_{STPD} \cdot \left(\frac{P_o \cdot T_I}{T_o \cdot P_I}\right)^{-I}$$

Le tableau III donne quelques valeurs tabulées pour un capillaire de diamètre 0.1 mm, en utilisant le *m*-Xylène comme liquide mano-volumétrique.

On constate (équ. 15) que, toute chose restant égale par ailleurs, le volume d'O_2 consommé ΔV_{O2} correspondant à un déplacement donné Δ l (de 1 mm par ex.) n'est pas constant au cours de l'expérience mais subit une dérive comme L $= \Sigma \Delta$ l s'accroit

(18) $\Delta(\Delta V_{O_2}) = \frac{2 \cdot s \cdot \rho}{P_I} \cdot \Delta l$

Soit pour un diamètre de 0,2 mm : $\Delta(\Delta V_{O2}) = 5{,}28.10^{-6}$ μl/mm (S.T.P.D.) et pour un diamètre de 0,1 mm : $\Delta(\Delta V_{O2}) = 1{,}32.10^{-6}$ μl/mm (S.T.P.D.). Ainsi quand L s'accroît, $\Delta V_{O2}/\Delta l$ augmente, donc la sensibilité diminue. Cette dérive est indépendante de l_o.

TABLEAU III

l_o mm	$V_I \mu l$	S_{STPD} mm/μl	$V_{O2,STPD}$ μl/mm
50	27,9	-195,6	$-5{,}61\ 10^{-3}$
75	36,4	-223,5	$-4{,}91\ 10^{-3}$
100	43,1	-250,8	$-4{,}38\ 10^{-3}$
150	52,7	-303,0	$-3{,}62\ 10^{-3}$
200	59,5	-353,3	$-3{,}11\ 10^{-3}$
240	63,6	-390,6	$-2{,}81\ 10^{-3}$

c. *Incidences des variations de pression (P_1) et de température (T_1) sur l_o*

Les incidences décrites ici sont indépendantes de l'activité respiratoire. Elles s'ajoutent ou se retranchent des valeurs lues selon les cas.

— Variations de $P_I : l_o \longrightarrow l_o + \Delta l_p$

Ces variations ne mettant pas en cause la quantité gazeuse N_g, nous pouvons écrire que $P_2 . V_2 = C^{te}$. Une variation ΔP_1 entraîne un déplacement Δl_P de la colonne mano-volumétrique de même sens que P_1 et tel qu'à l'équilibre :

$$P_2 \cdot V_2 = (P_2 + \Delta P_I + \rho.\Delta l_p)(V_2 - s.\Delta l_p)$$

soit $\rho.s.\Delta l_P^2 - \Delta l_P(\rho.V_2 - P_2.s - s.\Delta P) - V_2.\Delta P = 0$

d'où

(19) $\Delta lp = \dfrac{A + \sqrt{A^2 + 4.\rho.s.V_2.\Delta P}}{2.\rho.s}$ avec $A = -s.\dfrac{\rho.\Sigma l^2 + \Delta P.\Sigma l + P_I(l_c + d)}{\Sigma\ l}$

Le tableau IV illustre la fonction $\Delta l_P/\Delta P = f(l_o)$ pour les capillaires 0,2 et 0,1 mm.

— Variations de T_1 : $T_I : l_o \longrightarrow l_o + \Delta l_T$

L'unité respirométrique réagit comme un thermobaromètre et nous pouvons écrire que le rapport P.V/T est constant :

$$\frac{P_2 \cdot V_2}{T_I} = \frac{(P_2 + \Delta P_2)(V_2 + \Delta V_2)}{T_I + \Delta T_I}$$

Dans le système considéré, toute variation du volume V_2 pour quelque cause que ce soit entraîne une variation de sens contraire de la pression P_2. Une variation positive de la température $\Delta T > 0$ produit une dilatation du volume interne V_2:$\Delta V_2 > 0$. La remontée conséquente de la colonne mano-volumétrique exprime la diminution de la pression interne $\Delta P_2 < 0$

$\Delta V_2 = - s.\Delta l_T$ $(\Delta l_T < 0)$ (par convention d'écriture)

$\Delta P_2 = \rho.\Delta l_T$

soit $P_2.V_2.\Delta T_I = T_I.\left\{(\rho.V_2 - s.P_2)\Delta l_T - \rho.s.\Delta l_T^2\right\}$

D'où $\rho.s.\Delta l_T^2 - \Delta l_T\ (\rho.V_2 - s.P_2) + \Delta T.\dfrac{P_2.V_2}{T_I} = 0$

soit

(20) $\Delta l_T = \dfrac{\rho.V_2 - s.P_2 + \sqrt{(\rho.V_2 - s.P_2)^2 - 4.\rho.s.\dfrac{P_2.V_2}{T_I}.\Delta T}}{2.\rho.s}$

avec $\rho.V_2 - s.P_2 = -s.\dfrac{\rho.\Sigma l^2 + P_I(l_c + d)}{\Sigma\ l}$

Pour ΔT donné, Δl_T dépend aussi de l_o. En supposant P_1 constant, l'équation (20) permet de calculer $\Delta l_T/\Delta T = f(l_o)$ (Tableau IV).

Dans le cas normal où P_1 évolue en réponse à une variation de la température du bain thermostatique dans lequel plongent les unités respirométriques (le caisson est étanche aux variations de pression externe), la variation P_1 résultante est telle que :

(21) $\Delta P_I = P_I.\dfrac{\Delta T_I}{T_I}$

On peut alors rechercher le Δl résultant des variations simultanées de T_1 et P_1. Soit donc $\Delta l_{T,P} = \Delta l_T + \Delta l_P$ pour un T donné. On peut réduire avec une très bonne approximation les équations (19) et (20) en éliminant le terme en Δl^2.

Soit (19') $\Delta l_P = \Delta P.\dfrac{V_2}{P_2.s - V_2.\rho}$

et (20') $\Delta l_T = T.\dfrac{P_2.V_2}{T_I}.\dfrac{I}{V_2.\rho - P_2.s}$

en substituant (21) dans (19'), il vient pour (19') + (20')

$$(22) \quad \Delta l_{T,P} = \Delta l_P + \Delta l_T = \Delta T . \frac{V_2}{T_I (V_2 . \rho - P_2 . s)} . (P_2 - P_I)$$

Les valeurs données pour exemple dans le tableau IV permettent de constater que l'utilisation des unités respirométriques en caisson hermétiquement clos garantit à ceux-ci une bien meilleure stabilité pour de faibles fluctuations (0,01° C) de la température du bain. La stabilité des paramètres P et T demeure cependant essentielle pour l'exploitation de ce principe de mesure avec le maximum de précision.

TABLEAU IV

Accroissement $\Delta\, l_{P1}$ ou $\Delta\, l_{T1}$ pour des variations de P_1 ou T_1.
Accroissement $\Delta\, l_{T,P}$ pour des variations de P_1 dépendantes des variations de T_1 (caisson respirométrique fermé).

l_o mm	50		100		180		215		250	
Ø mm	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
$\Delta\, l_{P1}$(mm) Δ P = 1 mm	0,48	0,93	0,96	1,83	1,67	3,15	1,97	3,68	2,25	4,17
$\Delta\, l_{T1}$ (mm) Δ T = 0,01 °	-0,17	-0,33	-0,34	-0,65	-0,66	-1,14	-0,71	-1,33	-0,82	-1,51
$\Delta\, l_{T,P}$ (mm) Δ T = 0,01°	-0,002	-0,003	-0,006	-0,009	-0,015	-0,023	-0,019	-0,031	-0,025	-0,040

III. Méthodes et mesures

La présentation théorique du système de mesure à pression et volume variables met en évidence les exigences méthodologiques auxquelles est contraint l'expérimentateur. Ainsi la Figure 3 montre que l_o devient rapidement une grandeur incompatible avec l'expérimentation qui impose une limite à la longueur des capillaires (on ne peut trouver dans le commerce des capillaires de ø 0,1 mm dont la longueur dépasse 305 mm !). La relation l_o vs V_1 (éq. 7) permet d'estimer pour un diamètre de capillaire donné l'ordre de grandeur de V_1 pour lequel l_o demeure dans les limites compatibles avec la pratique. Le volume de base de l'unité respirométrique est fixé à une valeur arbitraire sensiblement supérieure à la valeur V_1 maxi correspondant au l_o maxi retenu par l'expérimentateur. Celui-ci peut alors moduler à sa guise ce volume par l'ajout d'une quantité définie de liquide ou d'un élément de remplissage calibré dans la chambre de mesure afin de donner à V_1 une valeur approximative en rapport avec l_o désiré donc de la sensibilité recherchée (Fig. 3-éq. 17). D'autre part, la sensibilité du système aux fluctuations de pression et de température impose un contrôle et une régulation rigoureuse de l'étanchéité et de la stabilité thermique du caisson respirométrique (éq. 19-20-22).

La conception des unités respirométriques et du caisson respirométrique (Fig. 4) est guidée de plus par le souci de rendre *sûres* et *rapides* les manipulations sur les animaux dont la séquence est systématiquement la suivante :

a — prélèvement et pesée d'un individu
b — mise en place dans la chambre
c — ajustement de V_1 à la sensibilité désirée et réalisation des conditions expérimentales
d — fermeture de l'U.R. et mise en place dans le caisson respirométrique (Equilibre thermique, dépôt du liquide mano-volumétrique, lecture de l_o, mesures)
e — retrait des U.R. du caisson respirométrique
f — récupération et pesée de contrôle des animaux
g — remise en élevage ou nouvelle expérience.

Pour un individu, l'ensemble de ces opérations (qui ont lieu en deux temps) ne prend que 4 à 5 mn; soit environ 1 heure pour la prise en compte de 24 individus (opérations a, b, c, d) et 45 mn pour leur récupération (e, f, g), la préparation des 6 unités de contrôle comprise.

1. L'unité respirométrique

Les deux types d'U.R. (capillaires de diam. int. 0,1 et 0,2 mm) sont représentés sur la figure 4. Chaque U.R. est constituée d'un assemblage d'éléments métalliques dont la nature assure une inertie chimique et physique totale à l'humidité, l'eau et aux différentes solutions utilisées : laiton nickelé pour les éléments extérieurs, acier inox pour tous les éléments constituant la chambre respirométrique. Toutes ces pièces sont travaillées avec précision ce qui permet d'obtenir un ensemble d'unités dont les volumes intérieurs sont identiques pour un diamètre de capillaire donné. Pour les chambres adaptées au capillaire 0,2 mm, les volumes sont ajustés au V_1 choisi par le dépôt d'un volume connu de potasse à x % dans la partie réservoir h au moyen d'une microseringue ('réglage fin'), ou par l'addition d'un joint torique dans la chambre C ('réglage grossier') si nécessaire. Pour les U.R. adaptées au capillaire 0,1 mm, l'amplitude des valeurs possibles de V_1 est plus limitée et l'ajustement du volume intérieur se fait uniquement par la quantité plus ou moins grande de solution apportée dans le réservoir h. Dans les deux cas, la tabulation de la fonction l_o où $S = f(V_1)$ permet le choix rapide des modifications de volume à apporter aux chambres.

L'élément recevant l'animal est alors mis en place. Une grille (g) sépare cet espace du réservoir à potasse. L'animal est déposé dans la chambre qu'un filtre humide (k) en fibre de verre vient ensuite couvrir. Ce filtre est percé de telle sorte qu'il y ait continuité entre les différentes parties de la chambre respirométrique. L'ensemble ainsi constitué est logé dans le cylindre d'accueil auquel est scellé le capillaire. L'étanchéité de l'ensemble est assurée par pression et écrasement d'un joint torique. On remarque sur

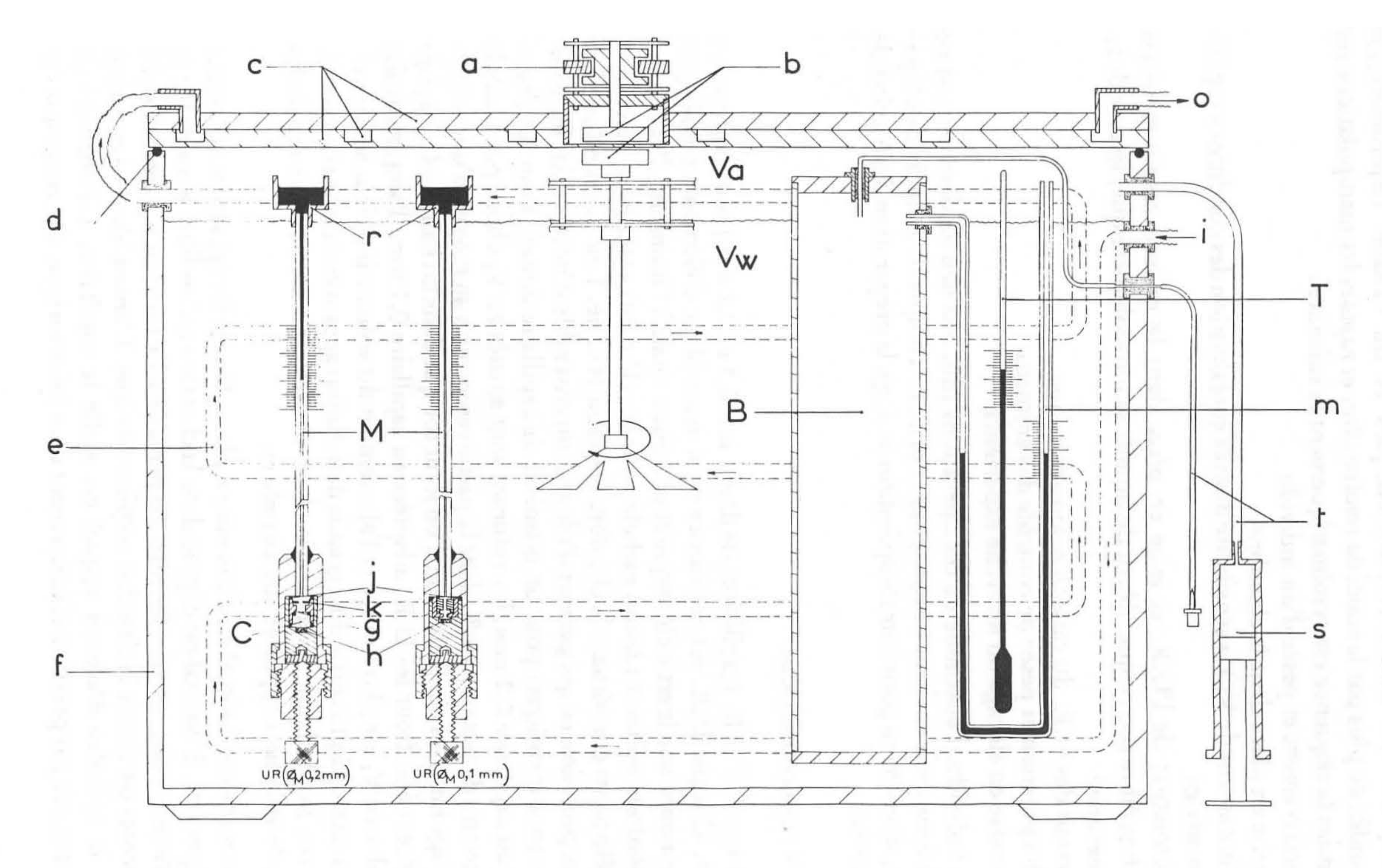


Figure 4 Représentation schématique de l'ensemble de microrespirométrie.
a) moteur de l'agitateur magnétique. b) barreaux magnétiques. c) couvercle thermostaté en aluminium. d) joint torique assurant l'étanchéité du caisson. e) échangeur thermique. f) caisson isobare-isotherme. g) grille inox. h) chambre d'accueil pour les solutions potassiques. i) entrée du liquide thermostatique. j) joint torique d'étanchéité. k) filtre de fibre de verre. m) manomètre interne de contrôle. o) sortie du liquide thermostatique. r) réservoir du liquide mano-volumétrique. s) seringue pour le contrôle de la pression interne. t) tuyaux souples pour le contrôle des pressions. B) chambre barométrique de référence. C) chambre de l'unité respirométrique (U.R.). M) tube de verre capillaire de diamètre intérieur 0,1 ou 0,2 mm. T) thermomètre de contrôle. Va) couche d'air. Vw) bain thermostaté.

sur la Figure 4 que les structures sont quelque peu différentes entre les deux types de chambre. En fait, selon les tailles des animaux et les conditions expérimentales choisies, l'expérimentateur adapte à son gré la structure des chambres.

2. Le caisson respirométrique

Le schéma de la Figure 4 donne les éléments constitutifs du caisson respirométrique. Il est caractérisé par une régulation poussée de la température interne du caisson : l'échangeur thermique (e) qui plonge dans le bain d'eau du caisson est associé au couvercle assurant l'étanchéité de l'ensemble et dans l'épaisseur duquel circule également le liquide thermostatique dont la régulation est assurée par un thermostat Haake N3-B (± 0,005° C). L'agitation simultanée de la couche d'air (Va) et du bain (Vw) assure un équilibre thermique remarquable dans le caisson. D'autre part, la pression interne est parfaitement contrôlée au moyen d'une chambre barométrique de référence (B), d'un manomètre (m), des tubes de connection avec l'extérieur (t) et d'une seringue externe (s) permettant une intervention précise en cas de dérive de cette pression. L'isolation du caisson et sa régulation permettent dans les conditions de température du laboratoire d'imposer des températures expérimentales très éloignées de l'ambiance.

3. Mesures

a. Choix du liquide mano-volumétrique

Deux caractéristiques essentielles doivent être recherchées à propos du liquide mano-volumétrique : une faible viscosité pour une meilleure pénétration dans les capillaires les plus fins et une très faible tension de vapeur afin que ne se crée pas dans le capillaire une augmentation progressive de la pression gazeuse qui provoquerait alors une dérive de la colonne mano-volumétrique. Après avoir travaillé longtemps avec du pétrole dont la viscosité est trop grande pour une application aux capillaires de 0,1 mm, nous avons actuellement fixé notre choix sur le 1,3-diméthyl benzène ou *m*-Xylène dont la tension de vapeur est remarquablement basse (4,5 mmHg à 15° C) pour un composé de si faible viscosité (0,650 cp à 15° C). Ce liquide peut être utilisé sans risque de dérive dans les deux types de capillaire considérés.

b. Temps zéro de la mesure : lecture de l_o

Après le temps nécessaire à ce que les chambres soient en équilibre thermique, le *m*-Xylène est déposé dans le réservoir r de chaque unité respirométrique. Ce liquide atteint rapidement la longeur l_o définie précédemment et 2 à 3 mn après le dépôt, le repérage peut se faire sur la grille millimétrée derrière laquelle sont positionnés les capillaires. Cette valeur l_o est l'*unique* paramètre caractéristique de *chaque* unité

respirométrique pour l'expérience en cours. Le report de cette valeur réelle dans une table dont le Tableau III donne un exemple simplifié, permet de lire la sensibilité effective de chaque unité respirométrique pour l'expérience en cours.

c. Relevé des données et calcul

A intervalle de temps régulier (15 mn par ex.) la position l de la colonne manovolumétrique est relevée pour chaque U.R. ainsi que pour les témoins. Si les l_o des témoins ont dérivé, le déplacement retenu pour le calcul de l'activité respiratoire est la différence entre le déplacement lu pour l'U.R. et la moyenne des dérives des témoins pendant le même intervalle de temps. Selon la précision recherchée pour la mesure, il peut être nécessaire d'apporter au résultat la correction due à la dérive de la sensibilité (éq. 18). Le tableau V présente une grille de données type et le mode de calcul correspondant.

TABLEAU V

durée (mn)		Témoin n° 1	Témoin n° 2	*Folsomia candida*
			(position l de la colonne)	
t_o	(l_o)	138,5	96,0	240,5 mm
15	(l)	137,0	95,5	243,0 mm
30		137,2	95,0	246,8 mm
45		138,0	95,5	250,5 mm
60		138,4	95,5	253,0 mm
75		138,4	96,0	255,0 mm
165		138,5	95,8	265,0 mm

Animal : *Folsomia candida*
Poids frais : 10 μg
Classe : jeune
Température : 20,10° C
Pression : 10340 mmH_2O
KOH : 10 % en poids
Filtre humide
Capillaire : 0,1 mm

Calculs

Sensibilité réelle : $l_o = 240,5$
(Condition ETPD)
$S^{-1} = 2,56\ 10^{-3}\ \mu l(O_2).mm^{-1}$

— Durée : de t_o à t = 75 mn
Déplacement : 14,5 mm
Correction : 0
Consommation totale d'O_2 : $2,56\ 10^{-3} \times 14,5 = 37,12\ 10^{-3}\ \mu l(O_2)$
Consommation horaire : *29,7* $10^{-3}\ \mu l.h^{-1}$

— Durée : de t = 75 à t = 165 mn
Déplacement : 10 mm
Correction : -0,1 mm
Consommation total d'O_2 : $2,56\ 10^{-3} \times 9,9 = 25,34\ 10^{-3}\ \mu l\ (O_2)$
Consommation horaire : *16,9* $10^{-3}\ \mu l.h^{-1}$

On retrouve dans cet exemple l'observation généralement faite sur les valeurs toujours plus élevées de l'activité respiratoire durant les premiers temps de la mesure. Le relevé fréquent des données permet de mieux saisir le moment où l'activité respiratoire se régularise.

IV. Conclusions

La mesure respirométrique à pression et volume variables intègre simultanément les variations dP et dV provoquées par la consommation d'oxygène au sein d'une chambre de mesure. Cette technique conserve la simplicité de manipulation du respiromètre d'Engelmann au bénéfice d'une sensibilité de l'ordre de 10^{-3} $\mu l.h^{-1}$ en lecture simple, à l'œil nu. Ce nouveau principe respirométrique est particulièrement adapté aux individus dont le poids frais se situe entre quelques microgrammes et quelques milligrammes. Tous les aspects techniques peuvent être assumés par un laboratoire équipé d'un atelier de mécanique. Les aspects numériques (tabulation des fonctions) sont résolus à l'aide d'une calculatrice de poche programmable. La capacité élevée du caisson respirométrique pouvant recevoir jusqu'à 30 unités respirométrique par expérience affirme la vocation écophysiologique de cette technique qui permet l'étude exhaustive des populations animales du sol.

Remerciements

La réflexion et la discussion critique menées quotidiennement avec Guy VANNIER, Maître de recherche au C.N.R.S., font partie intégrante de ce travail.

L'habileté et la disponibilité de M. Roger BOTTALA, électromécanicien de l'E.R. 204, ont assuré le passage rigoureux de la théorie à la pratique.

Je les remercie vivement.

Références

ENGELMANN (M.D.), 1963. — A constant Pressure Respirometer for Small Arthropods. — *Entomological News*, **24** : 181-186.

GILSON (W.E.), 1963. — Differential Respirometer of simplified and improved design. — *Science*, **141** : 531-532.

HOLTER (H.) & LINDERSTRØM-LANG (K.), 1943. — On the Cartesian Diver. — *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **24** : 17-18.

HOLTER (H.) & ZEUTHEN (E.), 1966. — Manometric techniques for single cells. *In* G. OSTER & A.W. POLLISTER (Eds.), *Physical techniques in biological research.* — Academic Press, New York - London : 251-317.

KLEKOWSKI (R.Z.), 1971. — Cartesian Diver microrespirometry for Aquatic Animals. — *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **18** : 93-114.

LINDERSTRØM-LANG (K.), 1937. — Principle of the Cartesian Diver applied to Gasometric Technique. — *Nature* (Lond.), **140** : 108.

LØVLIE (A.) & ZEUTHEN (E.), 1962. — The Gradient Diver. - A recording Instrument for Gasometric micro-analysis. — *Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **32** : 513-534.

NEXØ (B.A.), HAMBURGER (K.) & ZEUTHEN (E.), 1972. — Simplified microgasometry with Gradient Diver. — *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, **39** : 4.
PETERSEN (H.), 1981a. — Open Gradient Diver respirometry modified for terrestrial microarthropods. — *Oikos*, **37** : 265-272.
PETERSEN (H.), 1981b. — The respiratory metabolism of Collembola species from a Danish beech wood. — *Oikos*, **37** : 273-286.
SCHOLANDER (P.F.), 1942. — Volumetric Microrespirometers. — *Rev. Sci. Inst.*, **13** : 32-33.
VANNIER (G.) & VERDIER (B.), 1981. — Critères écophysiologiques (transpiration, respiration) permettant de séparer une espèce souterraine d'une espèce de surface chez les Insectes Collemboles. — *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **18** : 531-549.

Définition des symboles et unités

B Pression atmosphérique... (mm H_2O)
C Chambre respirométrique
d Hauteur du liquide mano-volumétrique dans le réservoir... (mm)
f Tension de vapeur de l'eau... (mm H_2O)
K,K' Constantes du calcul respirométrique
l, l_o Longueur de la colonne mano-volumétrique... (mm)
l_c Hauteur d'ascension capillaire... (mm)
L Somme des variations de l entre t_o et t... (mm)
M Tube capillaire mano-volumétrique
N Nombre de moles... (μM)
$\dot{O}_2$ Taux de l'activité respiratoire... ($\mu l.h^{-1}$)
P_o, P_1 ... Pression totale des gaz secs... (mm H_2O)
r Réservoir de liquide mano-volumétrique
R Constante des gaz parfaits
s Section du tube capillaire mano-volumétrique... (mm^2)
T Température... (°K)
t_i Temps indice i
U.R. Unité respirométrique
V, V_{O2} ... Volume de gaz ... (μl)
ϱ Densité du liquide mano-volumétrique
$\dot{S}$ Sensibilité... (mm.μl-1)

